

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCI.

1904

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XIII.

1° SEMESTRE.



ROMA
TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1904

Fisiologia. — *Ricerche sui nucleoproteidi e sui loro prodotti di scissione* ⁽¹⁾. Nota del dott. CARLO FOÀ, presentata dal Socio A. MOSSO ⁽²⁾.

I nucleoproteidi sono da riguardare come le sostanze proteiche più importanti e più diffuse negli organi e nei tessuti animali, e non è quindi a meravigliare se essi furono oggetto di studi numerosi ed importanti, fra i quali basti citare quelli di Kossel e dei suoi discepoli, dell'Hammarsten, di Wooldrige e di molti altri autori.

Ad un gruppo prostetico, secondo le denominazioni introdotte dal Kossel, che sarebbe la nucleina o l'acido nucleinico, starebbe legata una proteina, e lo schema della costituzione di un nucleoproteide sarebbe secondo Lilienfeld ⁽³⁾ il seguente:

Da questo schema apprendiamo che i primi prodotti di scissione del nucleoproteide sono una nucleina ed una proteina e che questa può essere un istone.

È su questo punto che noi faremo convergere di più la nostra attenzione perchè esso ha ingenerato per lungo tempo una confusione di nomi, e fu l'origine di classificazioni complicate, mentre un esame più attento avrebbe di molto semplificato le cose. Nucleoproteidi vennero estratti da tutti o quasi tutti gli organi ed i tessuti animali, e per quanto le sostanze che vennero estratte con metodi simili o addirittura identici siano state chiamate coi nomi diversi, tuttavia noi dobbiamo oggi ritenerle come formanti una sola categoria di corpi ben definiti e classificabili appunto come nucleoproteidi.

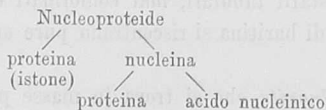
Così non debbono da essi essere disgiunti quei corpi che Hammarsten, Lönnberg, ed altri chiamarono *nucleoalbumine*, poichè questo nome, nel tempo in cui quelle ricerche vennero fatte, era usato come sinonimo di nucleoproteidi, e soltanto più tardi venne riservato a quelle sostanze proteiche che risultano dall'unione di una proteina con una pseudonucleina.

Noi troviamo così nei trattati più recenti di chimica delle sostanze proteiche ⁽⁴⁾ un intero Capitolo dedicato ai nucleoproteidi dei vari organi,

⁽¹⁾ Istituto di Fisiologia della R. Università di Torino.

⁽²⁾ Presentata nella seduta del 20 marzo 1904.

⁽³⁾ Lilienfeld, Arch. f. Anat. u. Physiol. Physiol. Abtheil. 1892, S. 128.



⁽⁴⁾ Bottazzi, *Trattato di chimica fisiologica*, vol. I, pag. 257. — Conheim, *Chemie der Eiweisskörper*, 1900, pag. 197. seg.

ed è appunto come uno speciale nucleoproteide che viene classificato il *nucleoistone* estratto da Lilienfeld⁽¹⁾ dal timo.

Precipitato il proteide dall'estratto acquoso dell'organo coll'aggiunta di un po' di acido acetico diluito, e purificato il precipitato, egli lo mise a digerire con una soluzione di acido cloridrico al 0,8 %, ed oltre al constatare che rimaneva un residuo indisciolto di nucleina, ricercò quale sostanza fosse passata in soluzione nell'acido cloridrico, e scoprì che essa possedeva reazioni pressochè identiche a quelle che il Kossel⁽²⁾ aveva trovato per l'*istone* dei globuli rossi di oca, e perciò anch'esso doveva essere ritenuto in istone.

Questo nucleoproteide del timo venne dunque chiamato nucleoistone, e così nacqero le due denominazioni distinte di nucleoproteidi e di nucleoistoni per molti anni usate dai ricercatori. Ma mentre per il nucleoproteide del timo erano state fatte ricerche sulla proteina che sta unita alla nucleina e sulla sua natura era stata basata la denominazione di nucleoistone, sulla proteina invece degli altri nucleoproteidi non vennero mai fatte ricerche, e pur non sapendosi se essi contenessero un istone, oppure no, si continuò a lasciar loro il nome di nucleoproteidi. Non occorre dire quanto poco giustificata fosse la divisione di queste due categorie di corpi, mancando per essi giusti criteri di differenziazione. Soltanto in questi ultimi tempi la divisione dei nucleoistoni dai nucleoproteidi parve più chiara e più giustificata in seguito alle ricerche di Bang⁽³⁾ e di Huiskamp⁽⁴⁾ i quali con metodi diversi riuscirono ad isolare dal timo due sostanze proteiche delle quali l'una si lasciava scindere in nucleina ed istone coll'acido cloridrico diluito e fu perciò ritenuta come nucleoistone, l'altra invece non conteneva istone e fu detta nucleoproteide.

Il metodo usato dal Bang per separare i due corpi consiste nell'estrarre l'organo con soluzione fisiologica di cloruro sodico, e da questo estratto precipitare con acido acetico il nucleoproteide che sarebbe privo di istone, poi estrarre ancora l'organo con acqua distillata e da questa precipitare con acido acetico il nucleoistone. Col mezzo di ripetute lavature dell'organo con soluzione fisiologica il Bang sarebbe riuscito ad allontanare tutto il nucleoproteide. Il metodo di Huiskamp invece consiste nel lavare dapprima l'organo con soluzione fisiologica di cloruro sodico ed estrarre poi la poltiglia con 5-6 volumi di acqua distillata. Dopo 24 ore circa di macerazione si allontanano con una prolungata centrifugazione le particelle dell'organo rimaste in sospensione e si precipita con cloruro di calcio il nucleoistone. Il nucleo-

(1) Lilienfeld, Zeitsch. f. Physiol. Chem. Bd. 18.

(2) Kossel, Zeitsch. f. Physiol. Chem. Bd. 8.

(3) Bang, *Bemerkungen ueber das Nucleohiston*. Zeit. f. Physiol. Ch. XXX, 1900.

(4) Huiskamp, *Ueber die Eiweisskörper der Thymudrüse*. Zeit. f. Physiol. Ch. Bd. XXXII, 1901.

proteide rimane in soluzione e può venir poi precipitato dopo un completo allontanamento del nucleoistone, coll'aggiunta di un po' di acido acetico. Da questo nucleoproteide l'A. non poté isolare l'istone. Se confrontiamo fra loro i metodi ed i risultati dei due autori citati, vediamo subito che il nucleo proteide da essi isolato e che sarebbe privo di istone non può essere il medesimo, perchè Bang lo isola dalla soluzione fisiologica che servi a lavare l'organo mentre Huiskamp di questo liquido non si serve, e dopo avere a lungo lavato l'organo cosicchè secondo Bang tutto il nucleoproteide ne sarebbe stato allontanato, riesce invece dall'estratto acquoso dell'organo a ricavarne il suo nucleoproteide. Se le cose stessero dunque come gli autori descrissero, dovrebbero esistere nel timo due nucleoproteidi diversi, dei quali uno potrebbe venir estratto con soluzione fisiologica, l'altro invece non passerebbe in questa ma si potrebbe estrarre con acqua distillata.

Vedremo in seguito come la cosa sia in realtà molto più semplice di così. Malengreau ⁽¹⁾ isolò dal timo mediante precipitazione frazionata con solfato di ammonio due corpi che egli impropriamente chiamò nucleoalbumine, dalle quali è possibile ricavarne un istone. Il metodo usato dal Malengreau è una « *Aussalzung* » metodo che è universalmente riconosciuto come assai opportuno per la separazione delle sostanze proteiche, e se si tien conto che i limiti di saturazione entro i quali precipita la nucleoalbumina A di Malengreau, sono ben lontani da quelli per cui precipita la nucleoalbumina B, sembra molto probabile che realmente le due sostanze estratte dal Malengreau siano ben distinte fra loro e nettamente differenziabili. Da quanto segue apparirà come invece assai male distinte siano le sostanze isolate dal Bang e dal Huiskamp, poichè potei dimostrare che il principale carattere differenziale su cui si basa la divisione dei due corpi, cioè la presenza o la mancanza di istone, è affatto insussistente. Il Bang non disse quale sostanza egli ricavasse diversa dall'istone col mezzo della digestione cloridrica del suo nucleoproteide; Huiskamp vide che il nucleoproteide da lui isolato è solubile in HCl al 0,8 % e non lascia deposito di nucleina, ma dializzandone la soluzione in modo da diminuire il grado di acidità di essa, o neutralizzandola in parte, il nucleoproteide torna a precipitare.

Le esperienze che seguono non confermano alcuna di queste asserzioni, e dimostrano invece che così il nucleoproteide di Bang, come quello di Huiskamp si lasciano scomporre dalla digestione cloridrica in un residuo insolubile di nucleina, ed in una sostanza proteica che resta sciolta nell'acido cloridrico e che presenta tutte le reazioni dell'istone.

Ricerche sui proteidi del timo, del fegato e del rene.

Associo in un solo capitolo le esperienze fatte su questi tre organi, perchè esse mi diedero gli stessi risultati e mi dimostrarono come esista una grande

⁽¹⁾ *La Cellule*, t. XVII, pag. 393. Id., t. XIX, pag. 284.

uniformità nella distribuzione delle sostanze proteiche nei tessuti, cosicchè solo forse la composizione centesimale di esse varia da un organo all'altro, ma le reazioni che esse presentano, permettono di unirle in una sola categoria.

Le esperienze vennero fatte su parecchi organi di animali diversi, e furono così più volte ripetute e controllate, ma per brevità, e perchè i risultati furono sempre costanti ed uguali per i vari organi, esporrò soltanto alcune delle esperienze eseguite, facendo precedere un riassunto del metodo usato per l'isolamento delle sostanze proteiche da analizzare. Esso è il metodo usato per la prima volta da Huiskamp, e fu seguito in tutti i particolari secondo le indicazioni dell'autore. Userò per ora i termini di nucleoistone e nucleoproteide, riservandomi di fare in seguito le opportune modificazioni.

L'organo veniva lavato con una prolungata circolazione artificiale di cloruro sodico in soluzione fisiologica (1) fino a che tutto il sangue ne fosse allontanato. La soluzione che aveva servito alla lavatura dell'organo veniva conservata per l'isolamento del nucleoproteide di Bang. In seguito l'organo veniva tagliuzzato, poi ridotto in poltiglia colla macchina tritacarne, e la poltiglia veniva posta a macerare per 24-48 ore con 5 volte il suo peso di acqua. Separate grossolanamente con un setaccio le particelle di organo rimaste in sospensione nell'estratto acquoso, questo veniva centrifugato a fine di separarlo completamente dalla poltiglia dell'organo, e da esso veniva precipitato il nucleoistone con una soluzione di cloruro di calcio, aggiungendone tanta che il sale venisse a trovarsi nell'estratto acquoso nella porporzione dell'uno per mille. Ottenevo così un abbondante precipitato fioccoso di nucleoistone che lascio depositare spontaneamente e che poi, decantato il liquido sovrastante (A), purificavo sciogliendolo in acqua leggermente alcalina per NH_3 , riprecipitandolo con cloruro di calcio per ben tre o quattro volte, e lavandolo infine con una soluzione di cloruro di calcio all'un per mille.

Il liquido A veniva a lungo centrifugato per allontanare completamente il nucleoistone che ancora vi si fosse trovato in sospensione, e aggiungendo poi poche gocce di acido acetico diluito si otteneva un nuovo abbondante precipitato fioccoso di nucleoproteide, che veniva poi lavato più volte con acqua leggermente acidulata con acido acetico. I precipitati di nucleoistone e di nucleoproteide venivano raccolti su filtro e poi stemperati accuratamente in una soluzione contenente 0,8 % di HCl. Dopo 24 ore di digestione la soluzione cloridrica veniva separata dal residuo indisciolto di nucleina mediante decantazione e filtrazione, e su di essa si faceva la ricerca dell'istone.

Sarebbe una inutile ripetizione l'espore partitamente i risultati ottenuti da queste ricerche eseguite sul timo, sul fegato e sul rene, poichè esse furono identiche per tutti questi organi: le reazioni presentate dalle soluzioni cloridriche che avevano servito alla digestione del nucleoproteide di Bang,

(1) Il timo veniva spezzettato e lavato in soluzione fisiologica frequentemente rinnovata.

oppure del nucleoproteide e del nucleoistone di Huiskamp erano in ogni caso le stesse, e non rendevano possibile alcuna differenziazione delle sostanze che erano state sottoposte alla scomposizione, dimostrando così ingiustificata una diversa classificazione e denominazione di queste.

Ecco in breve queste reazioni: la soluzione cloridrica dà con idrato sodico un precipitato che si discioglie in lieve eccesso di reazione. Bollendo non coagula nè precipita. Con acido nitrico, quando non venga aggiunto in troppa quantità ed evitando così il formarsi della reazione xantoproteica, si ottiene un precipitato che si ridiscioglie al calore e ricomparisce a freddo. Dà la reazione xantoproteica e quella violetta del biuretò. Con ammoniacca diluita aggiunta lentamente dà un precipitato che non si ridiscioglie in eccesso di reagente, ma è invece solubile in idrato sodico, in acido cloridrico ed in acido acetico. Con cloruro sodico aggiunto in sostanza si ottiene un precipitato che non scompare bollendo, che non si ridiscioglie negli acidi nè in ammoniacca. Con cloruro d'ammonio si ha un precipitato insolubile in acido acetico, cloridrico e in ammoniacca.

Quando alle proprietà del precipitato ottenuto con ammoniacca occorre aggiungere alcune osservazioni che vengono in appoggio di quanto già il Bang aveva trovato nel suo accurato studio sull'istone⁽¹⁾. Il precipitato ottenuto con ammoniacca dalla soluzione di istone al 0,2-0,3 % di HCl, scompare se si aggiunge nuovo acido cloridrico, o un po' di acido acetico. Però se si aggiunge prima un po' di cloruro di ammonio, il precipitato non è più solubile in acido cloridrico, e se si aggiunge acetato sodico non è più solubile in acido acetico. Perchè il precipitato divenga dunque insolubile negli acidi è necessaria la presenza di un sale dell'acido stesso, e questo accade perchè venendo ad aumentare nella soluzione la concentrazione dell'unione dell'acido, si diminuisce il grado di dissociazione di questo e con ciò la concentrazione degli H-ioni.

Se la soluzione di istone era fatta non già in acido cloridrico a 0,2-0,3 % ma all'1-2 %, occorrerà molta ammoniacca per ottenere il precipitato, ed essendo così formato molto cloruro d'ammonio, il precipitato diviene insolubile in HCl. Un fatto analogo avviene partendo dalla soluzione di istone resa neutra mediante la dialisi. Dializzando per due o tre giorni la primitiva soluzione di istone in acido cloridrico al 0,8 %, si ottiene una soluzione perfettamente neutra, in cui non si è formato alcun precipitato. Essa dà la reazione del biuretò, quella caratteristica coll'acido nitrico, precipita coi reagenti neutri degli alcaloidi (fosfomolibdato di sodio, picrato di sodio, ferrocianuro di potassio).

Aggiungendo una sola goccia di ammoniacca anche diluitissima, si scorge il formarsi di un debole precipitato che subito scompare. Per ottenere un

(¹) Bang, *Studien ueber Histon*. Zeit. f. Physiol. Ch. Bd. 27, s. 463.

precipitato stabile bisogna usare una soluzione di ammoniaca all'1 per centomila, oppure esporre ai vapori di ammoniaca concentrata la soluzione neutra di istone. Se invece alla soluzione dializzata di istone si aggiunge un poco di acido cloridrico, allora il precipitato che si ottiene con ammoniaca è insolubile in eccesso di reagente, in grazia del cloruro d'ammonio che si è formato e che trovandosi in soluzione coll'ammoniaca e avendo con essa il catione comune, ne diminuisce il grado di dissociazione e quindi la *forza*. Se alla soluzione ammoniacale di istone ottenuta partendo dalla soluzione neutra aggiungo dell'acido cloridrico, il precipitato di istone ricomparisce ed è insolubile in eccesso di acido cloridrico. Questo è dovuto al formarsi di cloruro d'ammonio e concorda col fatto detto sopra che il precipitato ottenuto aggiungendo cloruro d'ammonio in sostanza è insolubile in acido cloridrico. Così si spiega come alle volte partendo da una soluzione originale di istone che contenga acido cloridrico si possa ottenere un precipitato coll'ammoniaca quando la reazione del liquido è ancora acida: il precipitato è dovuto al formarsi di cloruro di ammonio, e si produce malgrado la presenza di acido cloridrico perchè in esso è insolubile. Una relazione come quella che esiste fra il cloruro di ammonio e l'ammoniaca non esiste invece, per ciò che riguarda l'istone, fra idrato sodico e cloruro sodico. Infatti l'aggiunta di cloruro sodico ad una soluzione neutra di istone, non salva il precipitato che si forma per l'aggiunta di poco idrato sodico dal ridisciogliersi in eccesso di reagente. Questo è dovuto al fatto che l'idrato sodico è una base assai più forte che non l'ammoniaca, e non basta diminuirne un poco il grado di dissociazione aggiungendo un sale avente con essa un ione in comune per diminuirne di molto la forza.

Perchè la reazione coll'ammoniaca avvenga nettamente in tutti i particolari che si sono detti, è necessario che l'istone si trovi in una discreta concentrazione, perchè se la soluzione è troppo diluita la reazione non si verifica.

Quanto al potere che secondo Bang avrebbe una soluzione neutra di istone, di precipitare le sostanze proteiche dalle loro soluzioni neutre, esso non mi parve costante, e sia che io usassi istone di timo, di fegato o di rene, osservai con difficoltà il prodursi di un precipitato nelle soluzioni di ovoproteine o di peptone; mentre il precipitato si produceva più abbondante e più facilmente per l'aggiunta di soluzione neutra di istone a siero di sangue. Potei invece constatare la costanza della precipitazione dell'istone coi reagenti degli alcaloidi in soluzione neutra, e il comportamento delle soluzioni di istone al calore. Una soluzione di istone in acido cloridrico al 0,8 %, od una soluzione neutra non precipitano al calore, ma se a quest'ultimo si aggiungono poche gocce di una soluzione di cloruro sodico all'1 % allora essa si intorbida al calore. Non si può tuttavia parlare di una vera coagulazione, bensì piuttosto della formazione di un precipitato che è facilmente solubile

negli acidi diluiti. Quanto al comportamento dell'istone coll'ammoniaca e coi sali di ammonio, i risultati che esposi più sopra concordano perfettamente con quelli di Bang e non permettono di comprendere come Huiskamp abbia potuto attribuire al cloruro d'ammonio un'azione inibente sulla precipitazione dell'istone coll'ammoniaca, mentre secondo i risultati di Bang ed i miei succedrebbe l'opposto.

Traendo ora in breve le conclusioni di quanto venimmo esponendo, noi dobbiamo ammettere che così dal fegato come dal timo e dal rene, e non solo dal nucleoistone estratto da questi organi, ma anche dal loro nucleoproteide (seguendo i metodi e le denominazioni di Bang e di Huiskamp) sia possibile di ricavare mediante digestione con acido cloridrico al 0,8 % una sostanza che ha tutti i caratteri dell'istone. Non riesco pertanto a spiegarmi come il Bang non abbia potuto ottenere un istone dal fegato e dal rene, mentre a me e prima che a me a Spitzer⁽¹⁾ dal fegato, ad Herlitzka e Borrino⁽²⁾ dal fegato e dal rene, riuscì facilissimo di ricavare un istone.

Ma la conclusione di maggior importanza che possiamo trarre dalle esperienze sopra riferite è che non è possibile di differenziare un nucleoproteide da un nucleoistone per la presenza in questo e non in quello di istone. La divisione di queste due sostanze che non aveva fondamento sicuro prima dei lavori di Bang e di Huiskamp, non ne acquista uno migliore dopo questi lavori, poichè il cosiddetto nucleoproteide dei due autori citati, non è a sua volta che un nucleoistone nel senso che da esso è possibile di ricavare un istone. Huiskamp dice che il suo nucleoproteide è solubile in acido cloridrico al 0,8 % e che dializzando questa soluzione, il nucleoproteide precipita quando per la dialisi il grado di acidità diminuisce; ma io non potei assolutamente confermare questo reperto.

Digerendo quantità pressochè uguali di nucleoproteide e di nucleoistone di Huiskamp con uguali volumi di soluzione cloridrica, trovai che la quantità di nucleina rimasta indisciolta nelle due miscele era presso a poco la medesima, e la soluzione cloridrica sovrastante che teneva in soluzione l'istone, non dava alcun precipitato per una dialisi anche prolungata fino a che il liquido avesse reazione esattamente neutra. Huiskamp dice ancora che gli riuscì talora di ottenere un precipitato con ammoniaca che non si ridiscioglieva in eccesso di reagente, dalla soluzione di acido cloridrico all'1-2 % che aveva servito a digerire il nucleoproteide. Aggiunge però che questo precipitato non doveva ritenersi costituito da istone: 1° perchè era insolubile negli acidi; 2° perchè si formava a reazione ancora acida del liquido; 3° perchè si ridiscioglieva difficilmente in idrato sodico. Secondo quanto dicemmo sopra

(1) Spitzer, *Die Bedeutung gewisser Nucleoproteide für die oxydative Leistung der Zelle*. Pflüger's Arch. Bd. 67, s. 649-650.

(2) Herlitzka et Borrino, Arch. Italiennes de Biologie, T. XXXIX, 1903.

intorno alle proprietà della reazione dell'ammoniaca, nessuno di questi tre argomenti può servire ad escludere che il precipitato ottenuto da Huiskamp non fosse istone. Vedemmo infatti come il precipitato che si ottiene coll'ammoniaca quando la soluzione di istone contiene molto acido cloridrico (nel caso di Huiskamp dall'1 al 2 %), è insolubile negli acidi e difficilmente solubile in idrato sodico a cagione del cloruro d'ammonio che si forma, e come pure il precipitato di istone si possa formare a reazione ancora acida del liquido perchè il cloruro d'ammonio formato e che provoca il precipitato stesso, lo rende poi insolubile in acido cloridrico.

Dalle esperienze stesse di Huiskamp è dunque lecito dedurre che non esiste un nucleoproteide dal quale non si possa ricavare istone, e nasce perciò il dubbio che il metodo dall'autore adottato per separare il nucleoproteide dal nucleoistone non valga a differenziare due sostanze nettamente distinte e come tali preesistenti nella cellula. Huiskamp ritiene che per l'aggiunta di cloruro di calcio all'estratto acquoso di timo, precipiti un sale calcico del nucleoistone, ma aggiunge che anche il nucleoproteide è in parte precipitato dal cloruro di calcio. Se si tiene conto dell'incertezza che tutt'ora regna sulla esistenza di vere combinazioni salino-proteiche e delle recenti esperienze di Fano ed Enriques⁽¹⁾ e di Galeotti⁽²⁾ che tendono ad escluderle, sembrerà molto difficile di accettare la così semplice e schematica spiegazione di Huiskamp intorno alla separazione dei due proteidi in questione, e nascerà forte il dubbio che la precipitazione ottenuta con piccole quantità di un sale sia dovuta ad un artificiale aggruppamento di molecole, e quindi ad un'artificiale divisione di sostanze, che non ci permette di trarre delle deduzioni sulla preesistenza di queste sostanze nell'organo vivente. Noi dobbiamo adunque riunire in una sola categoria di corpi i nucleoproteidi ed i nucleoistoni, e dar loro un solo nome che non ingeneri confusione e ci dica anche qualcosa sulla composizione della sostanza. Se teniamo conto del fatto che sia possibile di ricavare una nucleina ed un istone da tutti i proteidi di cui parliamo, parrebbe ovvio di racchiuderli tutti sotto il nome di nucleistoni, ma noi verremmo in tal modo ad ammettere senz'altra discussione che l'istone sia una sostanza preesistente e non un prodotto artificiale. Per chiarire quest'ultimo punto della questione, iniziai qualche esperienza sulla natura chimica dell'istone e sulla parte che gli spetta nella composizione dei proteidi cellulari. Di queste ricerche renderò conte in una prossima Nota.

(1) Fano ed Enriques, *Sui cosiddetti composti salino-proteici*. Rend. R. Acc. Lincei, 1903, 2° sem., pag. 491, e Arch. di Fisiologia, 1903, pag. 125.

(2) G. Galeotti, *Ueber die sogenannten Metallverbindungen der Eiweisskörper nach der Theorie der chemischen Gleichgewichte*. Zeitsch. f. Physiol. Chemie. Bd. XL. H. 5-6.